

VISUALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA TEJIDO-ESPECÍFICA MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER

J. CLAUDIO MORENO ROCHA, CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA, REYES TAMEZ GUERRA, DIANA RESÉNDEZ PÉREZ*

La manifestación de los genes en eucariotes presenta un patrón de expresión específico en tiempo y espacio durante el desarrollo de los diferentes organismos. La expresión génica depende de secuencias de control que se localizan en las regiones promotoras y potenciadoras, “enhancers” de los mismos. El promotor (cis-activadores) contiene secuencias nucleotídicas que son reconocidas por proteínas regulatorias que indican a la maquinaria transcripcional general que el mensaje codificado debe ser transcrito.^{1,2} En contraste, las secuencias potenciadoras tienen diversas funciones, la más general corresponde al incremento de la expresión basal del gen al que pertenecen,³ así como determinar el tejido y el tiempo de expresión de la unidad génica que regulan.⁴ El estudio de estas regiones regulatorias se ha realizado utilizando varias técnicas moleculares y diversos modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. La expresión específica de ciertos genes ha sido demostrada exitosamente en el campo de la biología del desarrollo, usando diversos genes reporteros mediante los cuales la localización y el tiempo específico de expresión son determinados a lo largo del desarrollo del organismo en estudio o en el sistema *in vitro* seleccionado.

Uno de los genes reporteros más usados ha sido la enzima bacteriana β -galactosidasa (β -Gal), utilizada por su fácil detección⁵ y recientemente el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) se ha aislado de la medusa *Aequorea victoria*.^{6,7} La GFP es una proteína de 27 kilo-Daltones (kDa) que emite una luz color verde con una longitud de onda de aproximadamente 508 nanómetros

(nm) cuando es excitada con luz ultravioleta (~ 395 nm) o incluso azul (~ 475 nm). Este gen presenta muchas ventajas sobre los genes reporteros tradicionalmente utilizados, ya que la detección se realiza *in vivo*, debido a que no depende de actividades enzimáticas o catalíticas, y el tejido o célula no requiere ningún tratamiento específico. Por otro lado, la proteína GFP es inocua para el organismo o tejido que la expresa, porque no interviene o desequilibra ninguna vía metabólica.

La visualización de los patrones de expresión al usar la proteína GFP como gen reportero generalmente se realiza mediante el uso de microscopía de fluorescencia, usando longitudes de onda capaces de excitar al cromóforo específico. La microscopía confocal láser⁶ presenta adicionalmente una alta resolución y mayor contraste en las imágenes mediante el uso de un rayo láser de longitud de onda específica que incide sobre el espécimen a estudiar. Además, es posible efectuar cortes virtuales o barridos de la imagen que se integra en tres dimensiones, y éstas pueden superponerse para la detección de un patrón de expresión específico integral en las células o los tejidos observados. Por otro lado, la microscopía confocal permite realizar experimentos simultáneos con diferentes canales de excitación de fluorocromos individuales, y detectar imágenes dinámicas con cinéticas de tiempo que pueden integrarse para proporcionar videoimágenes.⁸

Laboratorio de Inmunología y Virología y Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. San Nicolás de los Garza, N.L., México. dresende@uanl.mx

En el presente trabajo se expresó la proteína GFP en diferentes discos imaginales de larvas del tercer estadio de *Drosophila melanogaster*, utilizando el sistema binario del factor de transcripción de levadura GAL4. La expresión específica de tejido se obtuvo mediante la cruce de una línea que expresa este factor de transcripción, bajo la regulación de un promotor o potenciador con otra línea que contiene el gen reportero (GFP) bajo la regulación de un promotor con las secuencias de unión al factor trans-activador GAL4 (figura 1).

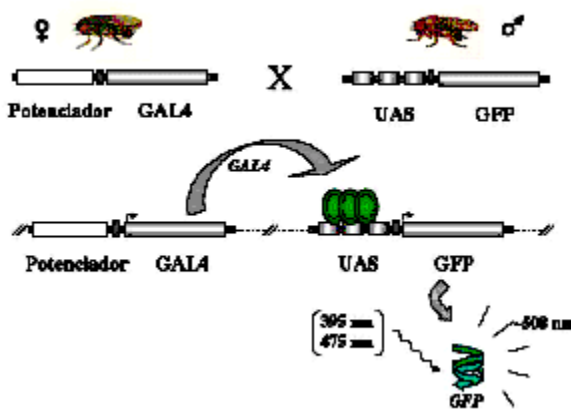


Fig. 1. Expresión de la proteína GFP usando el sistema GAL4. En este sistema la línea de moscas transgénicas que expresa el factor transcripcional GAL4 es dirigida por un potenciador específico de tejido que se cruza con otra línea, la cual posee la región que codifica a la proteína verde fluorescente (GFP) bajo la regulación de las secuencias de unión para el factor GAL4 (UAS). Al expresarse GFP se produce una proteína que al recibir radiación ultravioleta se excita y emite luz verde.

Las secuencias potenciadoras utilizadas correspondieron a dos genes de *D. melanogaster* y *distal-less (Dll)*, el cual produce un factor de transcripción específico que está involucrado en la formación de las regiones distales de los apéndices como las patas, antenas y alas.¹⁰ Además, se analizó una de las regiones potenciadoras del gen M2 (M2-576), el cual no se ha descrito, aunque se ha postulado que tiene expresión específica en la antena. Los discos imaginales en las larvas de las cruces de las moscas transgénicas se analizaron mediante microscopía confocal láser, para determinar los patrones de expresión del gen reportero bajo la dirección de las regiones reguladoras de los genes *Distal-less (Dll)* y M2.

Materiales y métodos

Mantenimiento y cruces de *D. melanogaster*

Las moscas transgénicas utilizadas se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Biología del Desarrollo del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, al igual que del Centro Bloomington de la Universidad de Indiana, en Estados Unidos. Se utilizaron las líneas productoras con el DNA complementario al RNA mensajero (DNAc) de la proteína GAL4, bajo la regulación de las regiones potenciadoras con expresión específica de tejido *Distal-less (Dll)* y M2-576. Las dos primeras se cruzaron con la línea reportera UAS-GFP¹¹ que contiene el DNAc de la proteína GFP, bajo la regulación de las secuencias de unión al factor GAL4 (UAS, figura 2).

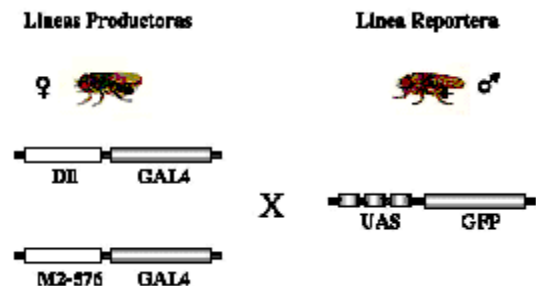


Fig. 2. Diagrama de las construcciones contenidas en los genomas de las moscas transgénicas utilizadas. Las líneas productoras (izquierda) esquematizan los potenciadores utilizados regulados al gen del factor transcripcional de levadura GAL4. La línea reportera (derecha) contiene la región que codifica para GFP regulada por las secuencias UAS con los sitios de unión al factor GAL4.

Todas las líneas transgénicas fueron mantenidas como homocigotas viables o líneas balanceadas a 18°C, en tubos con medio de cultivo para *Drosophila*. Las líneas transgénicas se dejaron ovopositar durante dos días y se pasaron a tubos de cultivo frescos, y así sucesivamente hasta completar el número de copias requeridas. Los embriones se desarrollaron a 25°C hasta la eclosión de los adultos, lo cual corresponde a aproximadamente de diez a once días después de la ovoposición.

La colecta de hembras vírgenes de las líneas productoras se realizó de la siguiente manera: por la mañana se desecharon las moscas eclosionadas de

cada línea transgénicas, dejándose desarrollar a 25°C. Cada tres horas se revisó el cultivo anestesiando a las moscas con CO₂, y colectando la población las hembras recién eclosionadas en tubos separados con medio de cultivo fresco. En el caso de la línea reportera, se colectaron machos. Las cruza se realizaron colocando tres hembras de la línea productora por cada macho de la línea reportera en un tubo de cultivo con medio fresco. Se dejaron cruzar durante un par de días a 25°C, y se pasaron a otro tubo hasta tener al menos cinco copias de cada crua. La progenie se dejó desarrollar a 25°C hasta obtener larvas del tercer estadio.

Disección de discos imaginales de *D. melanogaster*

Durante el desarrollo de la *D. melanogaster*, los apéndices del cuerpo se desarrollan a partir de primordios de células conocidos como discos imaginales. Éstos presentan una morfología determinada, por lo que es fácil su identificación durante la disección de larvas (figura 3). Para este estudio se utilizaron larvas del tercer estadio, de las cuales se disecaron con la ayuda de pinzas y agujas de disección los discos imaginales de pata, ojo-antena y ala en una gota de amortiguador de fosfatos a pH 8 o PBS 1X (8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄ y 0.24g KH₂PO₄ en 1L de agua). Éstos se colocaron en PBS 1X y se fijaron en una solución de glutaraldehído al 0.75% preparado en PBS 1X, durante 3 min. Posteriormente, se lavaron varias veces en PBS 1X y se montaron en glicerol al 40% para su posterior observación.

Detección de la expresión de GFP

Una vez disecados y montados los discos imaginales provenientes de las cruza entre las líneas productoras y reporteras, se observaron mediante microscopía confocal láser con un microscopio confocal Olympus IX70. La observación se realizó con una longitud de onda de excitación de 490 nm y de emisión de 520 nm, que corresponde al canal de visualización para el cromóforo fluorescente FITC (Isotiocianato de fluoresceína 5). Los filtros de absorción usados para este canal fueron BA510IF y BA550RIF, y se utilizó el tiempo de barrido de imagen más lento con la apertura confocal menor para obtener la máxima resolución en las imágenes. Se detectaron las regiones específicas en las que se

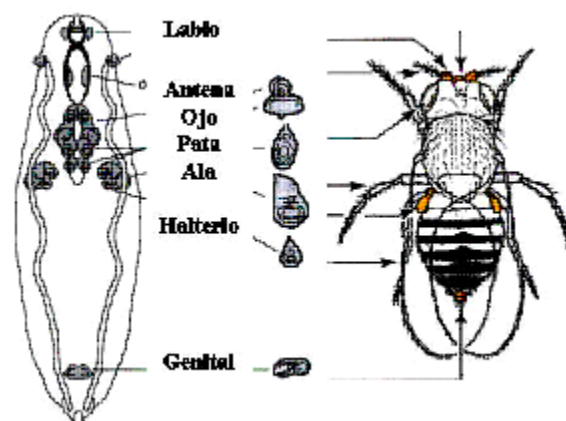


Fig. 3. Discos imaginales de larvas de tercer estadio de *D. melanogaster*. El diagrama muestra la equivalencia de cada disco imaginal de las larvas (izquierda) con las partes correspondientes en el adulto de *D. melanogaster* (derecha) (Modificado de Friston y cols., 1969 y Bodenstein 1950).^{12,13}

expresó GFP en los diferentes discos imaginales que originan a las patas, antenas-ojos y alas en adultos. Se fotodocumentaron las imágenes digitales mediante el programa de Flouview versión 1.263A (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, E.U.), y se almacenaron en formato TIFF y BMP para su procesamiento e interpretación posteriores.

Resultados

Las imágenes de cada disco imaginal de pata, ala y antena-ojo se analizaron en luz visible y fluorescencia. Para la descripción de los patrones de expresión observados se utilizaron al menos cinco larvas por cada crua realizada, usando la nomenclatura de los discos previamente publicada.¹⁴

Potenciador *Dll*

El potenciador *Dll* dirige la expresión en las regiones distales de los discos imaginales en *D. melanogaster*. En la figura 4 se muestra la expresión de GFP obtenido con este potenciador en los discos imaginales de pata, ala y ojo-antena.

En el disco de pata, la expresión es concéntrica a lo largo de cada uno de los segmentos distales del disco. Así, se observa una expresión decreciente desde los segmentos distales, tarso (Ta), tibia (Ti) y fémur (Fe), disminuyendo en trocanter (Tr) y coxa (Co). En la región que originará el protorax (Pt) la expresión es muy débil o casi nula (figura 4a).

El disco imaginal de ala muestra el patrón característico de este potenciador, localizando la fluorescencia de la franja correspondiente a la región distal del ala. Se observa la expresión más intensa en la región que corresponde a la doble y triple fila de cerdas del ala adulta (TfB y DfB), disminuyendo hacia los extremos de esta región (figura 4b).

Dll mostró un patrón de expresión en el disco de ojo-antena localizado solamente en la región que originará la antena, en todos los segmentos antenales con excepción aparente del segundo segmento de la antena (An2, figura 4c).

Potenciador *M2-576*

En el potenciador *M2-576*, la expresión de GFP se localiza en los discos de pata en las regiones de la coxa y fémur de manera concéntrica (figura 5a). Se observa claramente la presencia de GFP en cada uno de los segmentos distales; asimismo, la definición de cada segmento.

M2-576 en el disco de ala muestra un patrón de expresión complejo. La mayor parte de la fluorescencia se localiza en la región anterior del disco en varias de las regiones que formarán la superficie dorsal del ala (S-Do) de manera estriada, mientras que en la región de la superficie ventral (S-Ve) la expresión es continua. Sin embargo, también se encuentra expresión en las áreas que formarán el *prescutum* (Pr) y *scutum* del ala (Sc, figura 5b).

La expresión de GFP dirigida por el potenciador *M2-576* en el disco de ojo-antena muestra una señal muy tenue en la región de la arista, similar a la expresión en la región distal del disco, como se encontró en el disco de pata. También se encuentra expresión tenue de GFP en la zona en la que se unen el disco de ojo y el de antena (figura 5c).

Visualización de la expresión de GFP en cortes transversales

Debido a que la expresión de GFP en los discos muestra un patrón de expresión variable en las diferentes regiones del disco según el enfoque realizado, se hicieron secciones utilizando el programa Flouview del microscopio confocal láser. Así se analizó la expresión de GFP en secciones continuas de 2 μ m de grosor para estudiar la expresión de GFP dirigida por el potenciador *Dll*, de una manera transversal en el disco de antena.

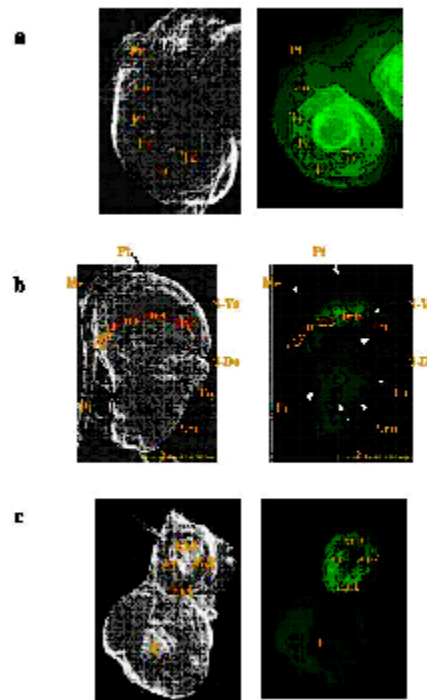


Fig. 4. Patrón de expresión de la GFP dirigido por el potenciador *Dll*. Las imágenes de los discos de pata (a), ala (b) y ojo-antena (c) muestran los patrones de expresión de GFP dirigidos por el potenciador del gen *Dll*. Para el disco de la pata: Pt = protorax, Co = coxa, Fe = fémur, Tr = trocanter, Ti = Ttibia y Ta = tarso. Para el disco del ala: Me = mesopleura, Pt = pteropleura, Pr = prescutum, Sc = scutum, Scu = scutellum, Po = postnotum, DfB = doble fila de cerdas, TfB = triple fila de cerdas, S-Do = superficie dorsal, S-Ve = superficie ventral, cP = coxa posterior, cM = coxa Media, cD = coxa dorsal, y fPP = fila posterior pelos. Para el disco de ojo-antena: An1 = 1^{er} segmento antenal, An2 = 2^{do} segmento antenal, An3 = 3^{er} segmento antenal, Ar = arista y E = ojo.

En la figura 6 se muestran 15 secciones obtenidas donde GFP se localiza en distintas regiones dependiendo de la profundidad del corte. En el extremo más distal del disco de la antena que formará la arista presenta una alta expresión de GFP, la cual disminuye hasta que prácticamente desaparece (figura 6, e-i) mientras se expresa en otras regiones más proximales del disco. De esta manera se puede comprobar que la expresión de GFP se encuentra presente en el segundo segmento antenal (An2), a diferencia de los niveles de expresión casi nula mostrados previamente sólo en una sección (figura 4c) y en las tres primeras secciones de la figura 6 (a-c). Las imágenes posteriores corroboran claramente la

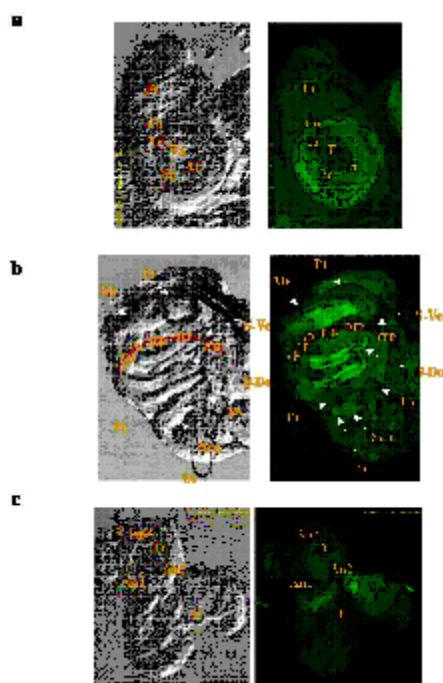


Fig. 5. Patrón de expresión de GFP dirigido por el potenciador M2-576. Las imágenes de los discos imaginales de pata (a), ala (b) y ojo-antena (c) en luz visible se representa a la izquierda y la correspondiente imagen fluorescente a la derecha. Cada segmento de los discos imaginales muestra la nomenclatura con iniciales como se describe en la figura 4.

expresión en el segundo segmento antenal (figura 6, d-g).

Discusión y conclusiones

En este trabajo fueron descritos los patrones de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) dirigida por dos diferentes potenciadores de *Drosophila melanogaster*, mediante la visualización de GFP, utilizando microscopía confocal láser.

Se utilizaron las regiones potenciadoras de los genes *Dll* y M2-576 de *D. melanogaster*. El patrón de expresión del potenciador *Dll* en los discos imaginales ha sido descrito utilizando β -Gal como gen reportero.¹⁵ En este trabajo se encontraron patrones muy similares para estos potenciadores en concordancia con lo reportado previamente. Esto último es importante, ya que se han encontrado ligeras diferencias entre la sensibilidad detectada para β -Gal y GFP.^{16,17} Sin embargo, los altos niveles de transcripción que promueven estos potenciadores

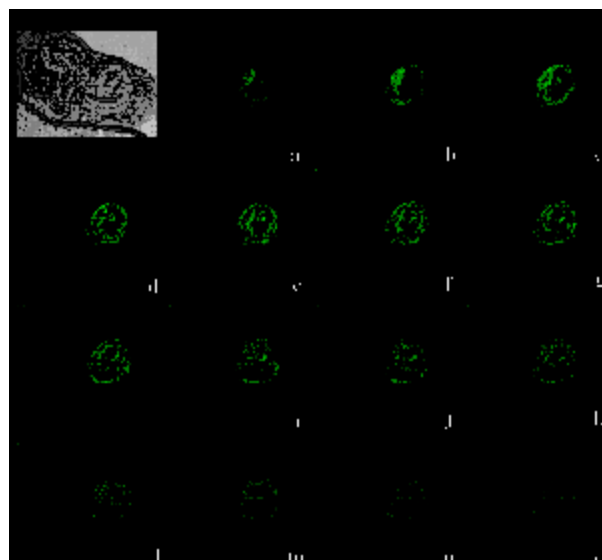


Fig. 6. Expresión de GFP dirigida por *Dll* en cortes transversales de un disco imaginal de ojo-antena. La imagen del disco de ojo-antena muestra el disco en luz visible, los cortes transversales (a-o) muestran las secciones realizadas en cortes de 2 μ m de grosor. Se muestra la expresión de GFP en el disco de antena donde la expresión mayor se observa en las partes distales del mismo mientras que los últimos cortes (l-o) muestran expresión en las regiones proximales. El disco del ojo no muestra expresión de GFP.

permitieron visualizar con una alta eficiencia la expresión de GFP en los discos analizados.

Por otro lado, el patrón de expresión correspondiente al potenciador del gen M2-576 es descrito por primera vez. En los discos de pata, M2-576 presenta una expresión en las regiones más distales (figura 5a), en el ala la expresión es principalmente en la región anterior del disco, así como un diferente patrón de expresión en las superficies ventrales y dorsales del mismo (figura 5b). Finalmente, en el disco de ojo-antena, la expresión de GFP se encuentra en la región que originará la arista de la antena. Mientras que no fue posible detectar la expresión de GFP en la región que formará el ojo (figura 5c). Los patrones de expresión aquí mostrados fueron corroborados en nuestro laboratorio, al utilizar β -Gal (resultados no mostrados).

De manera adicional, logramos la visualización de la expresión específica de GFP en diferentes secciones del disco de antena dirigido por el potenciador *Dll* (figura 6). Estos resultados muestran las ventajas de esta técnica sin necesidad de hacer cortes histológicos y confirma la capacidad del análisis fino que posee la microscopía confocal láser para detectar

la expresión específica de la proteína reportera GFP.

Los patrones de expresión revelados por la expresión de la proteína reportera GFP dirigida por los potenciadores de los genes *Dll* y *M2-576* estudiados en este trabajo serán útiles para dirigir con alta precisión específica de tejido y tiempo la expresión de proteínas de interés como homeoproteínas y factores de regulación expresados de manera ectópica en tiempos y tejidos diferentes en la mosca *D. melanogaster*.

El conocimiento de los patrones de expresión específicos de tejido dirigidos por secuencias regulatorias, como las estudiadas aquí, constituyen una de las herramientas más útiles para el estudio de la compleja red de eventos de activación y represión génica que permiten el desarrollo de la mosca de la fruta *D. melanogaster*, la cual, a su vez, constituye uno de los mejores modelos animales en el campo de la biología del desarrollo.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Dr. Walter J. Gehring y Susanne Flister del Biozentrum de la Universidad de Basilea en Suiza por las líneas transgénicas y el apoyo en la realización de este estudio. Asimismo, agradecen el apoyo de Efrén Jaramillo Reyna y Suraya Merit Vargas en el mantenimiento de las líneas de *Drosophila* en el laboratorio y por el auxilio prestado en algunos de los experimentos. Los autores también agradecen el apoyo recibido para la realización de este trabajo al Conacyt 39479-Q, y a la UANL por el proyecto Paicyt (CN700-02).

Resumen

En el presente trabajo mostramos la proteína GFP en diferentes discos imaginales de larvas del tercer estadio de *D. melanogaster* utilizando el sistema binario del factor de transcripción de levadura GAL4. Este sistema consiste en la cruce de una línea productora que expresa GAL4 con una línea reportera que contiene el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), bajo la regulación de un promotor con las secuencias de unión al factor transactivador GAL4 (UAS). Las larvas resultantes de las cruces se disecaron para obtener los discos imaginales que se observaron mediante microscopía confocal láser (Olympus IX70). Se detectó la expresión de GFP en los diferentes discos imaginales que originan a las patas, ojo-antena y alas en adultos, sobreponiendo

las imágenes obtenidas con las registradas en luz transmitida. La localización de la expresión precisa de GFP dirigida por cada uno de las regiones potenciadoras fue para *M2-576* una expresión concéntrica en los discos de pata y del ala en la región anterior. *Dll* en las regiones distales del disco de pata, en la zona media del ala y los segmentos distales del disco de antena. Estos patrones facilitarán realizar estudios de la expresión de proteínas funcionales de interés en regiones tejido específicas basándonos en los patrones de expresión de GFP visualizados en este trabajo.

Palabras clave: Expresión genética, *Drosophila*, Genes reporteros, Proteína verde fluorescente, Sistema binario GAL4.

Abstract

We express green fluorescent protein in *Drosophila melanogaster* third instar imaginal discs using the GAL4 binary system. This system allows a tissue specific expression by crossing a producer line, which expresses the tissue specific GAL4 protein expression, with a reporter line, expressing the GFP reporter gene binding sequence (UAS sequences). The resulting larvae were dissected in order to obtain the imaginal disc visualized by Confocal Laser Microscopy (Olympus IX70). We use 490 nm as excitation light and 520 nm as emission light in FITC visualization channel. The GFP specific expression pattern directed by each one of the enhancer genes *M2-576* and *distal-less* will help in the study of other regulatory proteins directed expression cell or tissue visualized in this work.

Keywords: Genetic expression, *Drosophila*, Reporter gene, Green fluorescent protein, GAL4 binary system.

Referencias

1. Tjian R. (1995) Molecular machines that control genes. *Scientific American* 272:54-61.
2. Kadonaga J.T. (1998) Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92:307-313.
3. Merika M. y Thanos D. (2001) Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev* 11:205-208.
4. Blackwood E.M. y Kadonaga J.T. (1998) Going the distance: a current view of enhancer action.

- Science 281:61-63.
5. O'Kane C.J. y Gehring W.J. (1987) Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci 84:9123-9127.
 6. Hazelrigg T. (1998) The uses of green fluorescent protein in *Drosophila*. En: GFP green fluorescent protein: Properties, applications, and protocols. (Ed. Chalfie M. y Kain S.) Wiley-Liss New York pp 169-190.
 7. Tsien R.Y. (1998) The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem 67:509-544.
 8. Paddock S.W. (1999) Confocal Láser scanning microscopy. Biotechniques 27:992-1004.
 9. Watson T.F. (1997) Fact and artefact in Confocal Microscopy. Adv Dent Res 11:433-441.
 10. Cohen S.M., Brönner G., Küttner F., Jürgens G. y Jäckle H. (1989) Distal-less encodes a homoeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. Nature 338:432-434.
 11. Fischer J.A., Giniger E., Maniatis T. y Ptashne M. (1988) GAL4 activates transcription in *Drosophila*. Nature 332:853-856.
 12. Fristrom J. W., Raikow R., Petri W. y Stewart D. (1969) *In vitro* invagination and RNA synthesis in imaginal disc of *Drosophila melanogaster*. En: Problems in Biology: RNA in Development. (Ed. Hanley E.W.) University of Utah Press, Salt Lake City.
 13. Bodenstein D.L. (1950) The postembryonic development of *Drosophila*. En: The Biology of *Drosophila* (Ed. Demerac M.) Wiley Press, New York.
 14. Yeh E., Gustafson K. y Boulianne G.L. (1995) Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci 92:7036-7040.
 15. Díaz-Benjumea F.J., Cohen B. y Cohen S.M. (1994) Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila* legs. Nature 372:175-179.
 16. Shiga Y., Tanaka-Matakatsu M. y Hayashi S. (1996) A nuclear GFP/b β -galactosidase fusion protein as a marker for morphogenesis in living *Drosophila*. Dev Growth Differ 39:99-106.
 17. Timmons L., Becker J., Barthmaier P., Fyrberg C., Shearn A. y Fyrberg E. (1997) Green fluorescent protein/b β -galactosidase double reporters for visualizing *Drosophila* gene expression pattern. Dev Genet 20:338-347.